

具抗肿瘤活性的海洋微生物菌株的初步筛选^{*}

李 根¹, 陈瑞川², 林 昱¹

(1. 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物工程重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 厦门大学抗癌中心, 福建 厦门 361005)

摘要:本研究采用 MTT 法对海洋放线菌、细菌、霉菌及极地和大洋细菌进行细胞毒活性物质的筛选, 结果有 10% 放线菌及一株极地细菌具有细胞毒活性. 此外利用 DNA 修复特性在 *E. coli* 343/591 和 *E. coli* 343/636 之间的差异性, 对前面筛得的菌株进行 DNA 损伤的筛选, 结果得到两株活性菌株. 采用荧光染色观察得到 3 株具有诱导肿瘤细胞凋亡的菌株, 这些具抗肿瘤活性的菌株可供进一步研究.

关键词: MTT 分析法; DDRT 法; 细胞毒活性物质; 细胞凋亡

中图分类号: Q7

文献标识码: A

文章编号: 1009-8160(2002)01-0018-05

近年来, 国内外在海洋生物抗肿瘤活性物质筛选和研究上已取得了初步的成果. NCI 每年筛选的 3 万个新的抗肿瘤化合物中, 约有 5% 来自海洋生物; 业已证实, 约 10% 的海洋动物提取物有抗 P388 白血病细胞及 KB 细胞活性, 3.5% 的海洋植物提取物有抗肿瘤活性或细胞毒性^[1]. 这些化合物绝大多数具有独特的化学结构和明显的抗癌、抗病毒作用, 主要包括生物碱、多肽及蛋白质、萜类、大环内酯类、多糖类、脂类等, 其作用机理亦呈多样性, 有以影响 DNA、RNA、蛋白质为主的, 也有以干扰有丝分裂或诱导细胞内信息分子的改变为主的, 通常这些活性物质作用浓度甚微, 而且毒副作用较低^[2].

目前, 国内外寻找海洋药物的研究对象主要是海藻和海洋动物, 据报道, 到目前为止已成功分离到 5 000 多种具有生物活性的海洋天然产物, 但由于其含量低, 生物量有限, 分离提取的生产成本较高, 使得许多研究成果的应用推广受到限制. 因此, 人们把注意力转向海洋微生物的培养与发酵技术以及其代谢产物的研究上. 由于海洋微生物所处的海洋环境是十分独特的, 海洋微生物是产生新的生物活性物质极好来源之一. 同时海洋微生物的特点是繁殖快、易培养等, 可以结合现代发酵工程技术, 使之工业化生产, 降低海洋药物的生产成本^[3]. 本文以 MTT 法、DDRT 法及荧光染色法对从极地、大洋、近海大量分离得到的放线菌、细菌和霉菌进行抗肿瘤活性物质的筛选.

1 材料与方法

1.1 细胞株及试验菌株

^{*} 收稿日期: 2001-10-17

基金项目: 由科技部基础性工作项目《海洋药源生物种质资源和基因库的构建》和国家海洋局海洋生物工程重点实验室研究课题资助(No. HY9903)

作者简介: 李根(1978~), 男, 在读硕士研究生.

细胞株 人胃癌细胞 MGC 803, 由厦门大学抗癌中心提供.

试验菌株 343/591 为赖氨酸和生物素营养缺陷型并具有发酵乳糖能力和 DNA 修复缺陷的 *uvrB/recA* 菌种 343/636 为不能发酵乳糖的脯氨酸营养缺陷型菌株并具有紫外线损伤和 DNA 修复能力, 购自上海医药工业研究院.

1.2 待筛菌株

363 株海洋放线菌, 70 株极地及大洋细菌, 234 株海洋细菌及 26 株霉菌, 均由本实验室分离保存.

1.3 细胞培养

人胃癌细胞 MGC 803 于含 10% 小牛血清、 $100\text{U}/\text{cm}^3$ 青霉素、 $100\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 链霉素及 $50\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 卡那霉素的 RPMI 1640 培养液中, 在 37°C , 5% CO_2 及饱和湿度环境下培养、传代.

1.4 菌株发酵及发酵液的预处理

菌株接种于发酵培养基, 经 2d 活化后, 补加培养基, 28°C 摇床培养至对数生长期后期(细菌 3d、放线菌约 5d). 发酵结束后, 将发酵液转移至 10cm^3 的管子中, 超声波破碎 2min, $10^4\text{r}/\text{min}$ 离心 10min, 小心吸出上清液. 上清液用 $0.22\mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤除菌, 分装于小管中, 于 -20°C 冻存, 使用时以 RPMI 1640 培养液作适当稀释.

1.5 MTT 分析法

根据文献[4]作适当修改, 步骤如下:

细胞培养至 90% 铺底(处于对数生长期), 用胰酶消化液(0.25% 胰酶/D-Hank's 液)消化收集细胞, 吹打制成单细胞悬液, 苔酚蓝染色计算活细胞数, 接种细胞于 96 孔板中, 每孔加 200mm^3 悬浮细胞液, 在 37°C CO_2 培养箱培养过夜. 第二天加入各稀释度的菌株发酵液 20mm^3 , 继续培养 3d, 倒去培养液, PBS 洗 1 遍, 加入 MTT ($0.2\text{mg}/\text{cm}^3$) 100mm^3 , 在 37°C 培养 4h, 然后去除 MTT, 加 DMSO 与甘氨酸 NaOH 缓冲液(9:1) 200mm^3 , 摇床摇 0.5~1h, 酶标仪测定 570nm 吸光值. 其中四孔做全培养液空白对照, 四孔做细胞悬浮液对照, 每样平行测试 3 孔, 以阿霉素为标准参照. 抑制率计算式为:

$$\text{抑制率} = 100\% \times (\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{实验}}) / \text{OD}_{\text{对照}}$$

发酵液活性以 ID_{50} 衡量, ID_{50} 为抑制率为 50% 时, 发酵液所稀释的倍数; 抗癌药物的活性以 IC_{50} 衡量, IC_{50} 为抑制率为 50% 时, 样品的浓度.

1.6 DDRT 法(different DNA repair test)

根据文献[5]作如下修改: 343/636 和 343/591 菌株(通常一个菌落)分别接种于含 5cm^3 蛋白胨-肉汤培养基中, 在 37°C 振荡培养 16h, 用分光光度计测 450nm 处的 343/591 和 343/636 的 OD 值, 用蛋白胨-肉汤培养基稀释 343/636 菌液使其 OD 值与 343/591 相同, 在 100cm^3 中性红琼脂培养基中加入 1cm^3 菌液后倒入平皿中静置 1h, 将所要测定的放线菌发酵液和受试物滴加在覆盖于琼脂培养基上直径为 8mm 的滤纸片上, 37°C 培养 24h, 以丝裂霉素为标准药物对照, 根据发酵液产生的抑菌圈大小的差异来判定其对 DNA 造成损伤的大小及是否有抗肿瘤活性.

1.7 荧光显微镜观察细胞凋亡

根据文献[6]作适当修改, 步骤如下:

MGC 803 细胞按 $2\text{cm}^3/\text{瓶}$ 接种于 10cm^3 细胞培养瓶中, 37°C 过夜, 每瓶加 10mm^3 菌株发

酵液,对照组仅加同量培养液,37℃继续培养 1~ 2d 后,收集细胞,细胞涂片,以细胞固定液[甲醇 冰乙酸(3: 1),现配]4℃固定 5min,蒸馏水稍洗后,滴加 Hoechst 33258 染色液(5μg/cm³ Hoechst 33258)染色 10min.蒸馏水洗片后,用滤纸沾去多余液体,吹干.封片剂(封片液:20mmol/dm³ 柠檬酸,50mmol/dm³ 磷酸二氢钠,50% 甘油,pH 5.5)封片后荧光显微镜观察.

2 实验结果与分析

2.1 MTT 分析法

本文采用 MGC 80-3 细胞,以 MTT 分析法为筛选模型,对 363 株海洋放线菌,70 株极地及大洋细菌,234 株细菌和 26 株霉菌的发酵液进行细胞毒活性筛选.初筛以 550 倍的稀释度为标准,当其 ID₅₀大于 550 的时候,再进行复筛,以确定菌株发酵液的 ID₅₀.筛选结果(表 1)表明,约有 10% 的海洋放线菌及一株极地细菌 ID₅₀大于或等于 550,其中最大 ID₅₀可达 22 000.

表 1 具有细胞毒物质的海洋微生物筛选结果

Tab. 1 Screening result of marine microorganism having cell toxicity

样 号	ID ₅₀	样 号	ID ₅₀
S-51	1 650	S-350	600
S-52	1 650	S-351	550
S-60	1 100	S-357	650
S-62	1 320	S-363	550
S-64	660	S-385	550
S-65	1 650	S-390	1 650
S-73	1 650	S-431	550
S-92	1 650	S-448	600
S-95	880	S-459	600
S-153	550	S-467	550
S-176	1 650	S-468	550
S-182	550	S-477	15 000
S-183	880	S-478	780
S-196	3 300	S-492	770
S-233	550	S-494	700
S-236	1 650	S-502	550
L- 4	3 000	S-505	5 500
L- 14	550	S-513	22 000
J-7	550	S-515	680

注:其中作为标准药物的阿霉素的 IC₅₀在 0.025~ 0.03μg/cm³ 之间.

2.2 DDRT 法

利用 DDRT 法对 MTT 粗筛得到的 38 株放线菌和细菌进行 DNA 损伤的检测,结果得到 A-132、A-442 两株放线菌对 DNA 产生损伤,其在 343/591 和 343/636 平板上的实验结果(表 2)如下:

表 2 放线菌和丝裂霉素对照对两个菌株的抑菌活性比较

Tab. 2 Bacteriostatic activity of actinomycetes and mitomycin towards two strains

受试物	343/ 591 抑菌圈直径(mm)	343/ 636 抑菌圈直径(mm)
S-182	13	-
S-492	13	-
丝裂霉素 0.5μg	23	-

2.3 荧光染色显微镜观察

经 S-176、S-95 和 L-4 3 株放线菌发酵液(终稀释度均为 1:200)处理后,荧光染色显微镜下观察, MGC 803 细胞核内可见浓染致密的颗粒或块状蓝色荧光, 荧光亮度明显增强, 染色质多集中于结构完整的核膜边缘, 形成环状、新月状、僧帽状的浓染带, 部分细胞的核固缩、碎裂, 成为细小的碎片. 而对照组 MGC 803 细胞的细胞核呈均匀弥散荧光, 核的大小、形态一致. 表明上述 3 个菌株可产生具有诱导肿瘤细胞凋亡的活性物质.

3 讨论

3.1 MTT 分析法

MTT 法是一种检测细胞生存和增殖状态的方法, 该方法以其简单、快速、准确等优点被用于细胞毒和淋巴因子生长抑制的定量检测, 尤其在肿瘤化疗药敏实验中广泛使用. 其原理是 MTT 可被活细胞线粒体中的脱氢酶还原为蓝色的甲 化合物, 再经适当溶剂溶解后, 其吸光度与活细胞数相关, 从而可作为检测活细胞数的指标. 因此 MTT 法可用于细胞毒活性物质的筛选.

3.2 DDRT 法

DDRT 法是一种利用两个菌株对 DNA 损伤修复的差异性建立的方法, 可以用来检测试物的 DNA 毒性. 343/591 为 DNA 修复缺陷菌株, 而 343/636 菌株具有紫外线损伤和 DNA 修复能力, 因而通过两个菌株的修复能力不同可以检测出受试物的 DNA 毒性. 从抗肿瘤药物的作用机理来看, 多数抗肿瘤药物的作用机制主要是作用于 DNA, 因而 DDRT 法可用于筛选得到作用于 DNA 的抗肿瘤活性菌株.

3.3 荧光染色显微镜观察

细胞凋亡是一种不同于坏死的死亡形式, 其特点之一是细胞在凋亡过程中细胞核内的染色质通常会发生凝聚作用, 形成块状、致密的染色质. 因此, 加入荧光染料 Hoechst 33258 后, 凋亡细胞由于膜通透性的改变, 可摄取 Hoechst 染料, 后者与 DNA 结合, 在紫外光下呈浓度致密的颗粒块状蓝色荧光. 正常细胞也可摄取少量 Hoechst 荧光染料, 而坏死细胞则不能摄取, 故在荧光显微镜下, 可观察到正常细胞的细胞核呈弥散均匀蓝色荧光.

4 小结

通过以上几种方法的筛选, 我们得到了两株通过对肿瘤细胞的 DNA 产生损伤从而抑制肿瘤细胞生长繁殖的菌株及 3 株对肿瘤细胞具有诱导凋亡作用的菌株, 可以提供作为进一步的分离研究. 我们对海洋放线菌抗肿瘤活性物质的筛选和初步研究表明, 海洋放线菌中蕴藏着丰富的抗肿瘤活性物质, 进一步的筛选和研究有望从中筛选出独特结构及作用机理的抗肿瘤活性物质.

参考文献:

- [1] 廖辉南, 戴建凉. 海洋生物抗肿瘤活性物质的研究进展[J]. 生物工程进展, 1995, 15(1): 8~14.
- [2] Faye F. Chemical prospectors scour the seas for promising drugs[J]. Science, 1994, 266: 1324.
- [3] Attaway D H, Zaborsky O R. Marine biotechnology. Vol I. Pharmaceutical and bioactive natural products[M]. Plenum Press, 1993, 419~458.
- [4] Mosmann F. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and

cytotoxicity assay[J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55~ 63.

- [5] 许文思, 彭剑, 王吉成, 等. 一种新的快速简便的抗肿瘤药物筛选模型[J]. 中国抗生素杂志, 2001, 28(1): 15~ 18.
- [6] Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J P. Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis [J]. Methods in Cell Biology, 1994, 41: 15~ 38.

The screening of antitumor active material from marine microorganism

LI Gen¹, Chen Rui-chuang², LIN Yu¹

(1. The Key Laboratory of Marine Biotech, SOA/ Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China; 2. The Cancer Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A screening model of MTT was used to identify antitumor active material from marine actinomycetes, bacteria, molds and extreme bacteria. The results showed about 10 percents of actinomycetes and one polar bacterial strain have cell toxicity. Further more, according to the DNA repair test vitality different between *E. coli* 343/591 and *E. coli* 343/636, two positive strains were identified. By fluorescence dyeing, we observed that three strains had the ability to induce cell apoptosis. These strains can be further researched for antitumor drug study.

Key words: MTT assay; DDRT assay; cell toxicity agents; cell apoptosis